

学校编码:

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 21620110153935

UDC\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

塔玛亚历山大藻藻际生物鉴定及其种间  
相互关系研究

Study on the species identification and the species  
interactions in the phycosphere of *Alexandrium tamarense*

胡 丽 丹

指导教师姓名: 彭兴跃教授 高亚辉教授

专 业 名 称 : 水生生物学

论文提交日期: 2015 年 07 月

论文答辩时间: 2015 年 09 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015 年 07 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

摘 要	1
Abstract	3
第一章 引 言	5
第一节 塔玛亚历山大藻的研究现状	5
1.1.1 塔玛亚历山大藻赤潮简介	5
1.1.2 物种间相互关系概念	6
1.1.3 塔玛亚历山大藻藻际及藻菌关系的研究	7
1.1.4 甲藻孢囊简介	10
第二节 棕鞭藻简介	12
1.2.1 棕鞭藻的分类系统	12
1.2.2 棕鞭藻主要形态特征及繁殖方式	12
1.2.3 棕鞭藻营养类型与摄食策略	13
第三节 微藻的分类鉴定	14
1.3.1 形态分类法	14
1.3.2 化学分类法	14
1.3.3 分子生物学方法	15
第四节 微流控芯片技术的研究进展与应用现状	17
1.4.1 在细胞生物学研究中的应用	18
1.4.2 在蛋白质研究中的应用	18
1.4.3 在 DNA 研究中的应用	19
1.4.4 在临床诊断中的应用	19
1.4.5 在海洋生物学研究中的应用	19
第五节 本论文的研究思路和意义	20
第二章 棕鞭藻的生物学鉴定	22
第一节 实验材料、试剂与仪器	22
2.1.1 实验材料	22

2.1.2 实验试剂 .....	22
2.1.3 实验仪器 .....	22
<b>第二节 实验方法 .....</b>	<b>23</b>
2.2.1 主要试剂的配置 .....	23
2.2.2 藻的培养 .....	24
2.2.3 棕鞭藻基因组 DNA 的获取 .....	24
2.2.4 棕鞭藻基因组 DNA 的 18S rDNA、ITS 和 5.8S rDNA 序列扩增 .....	25
2.2.5 PCR 产物的纯化 .....	26
2.2.6 质粒的构建 .....	26
2.2.7 重组 DNA 转化大肠杆菌 .....	26
2.2.8 克隆培养 .....	27
2.2.9 CaCl <sub>2</sub> 感受态细胞的制备 .....	27
2.2.10 扫描电镜样品的制备 .....	28
2.2.11 透射电镜样品的制备 .....	28
<b>第三节 结果 .....</b>	<b>29</b>
2.3.1 棕鞭藻的形态学分析 .....	29
2.3.2 棕鞭藻的分子生物学分析 .....	32
<b>第四节 讨论 .....</b>	<b>41</b>
<b>第五节 小结 .....</b>	<b>45</b>
<b>第三章 基于微流控芯片的棕鞭藻生态学特征的研究 .....</b>	<b>46</b>
<b>第一节 实验材料、试剂与仪器 .....</b>	<b>46</b>
3.1.1 实验材料 .....	46
3.1.2 实验试剂 .....	46
3.1.3 实验仪器 .....	46
<b>第二节 实验方法 .....</b>	<b>47</b>
3.2.1 主要试剂的配置 .....	47
3.2.2 PDMS 灌流芯片的制作 .....	47
3.2.3 浓度梯度芯片的制作 .....	52
<b>第三节 结果 .....</b>	<b>57</b>
3.3.1 PDMS 灌流装置的结构及性能 .....	57

3.3.2 塔玛亚历山大藻在 PDMS 灌流芯片上的培养与观察 .....	62
3.3.3 浓度梯度芯片结构与性能 .....	70
3.3.4 塔玛亚历山大藻在浓度梯度芯片上的培养与观察 .....	72
第四节 讨论 .....	74
3.4.1 灌流芯片和浓度梯度芯片的设计 .....	74
3.4.2 <i>Ochromonas</i> sp. 营养与增殖 .....	78
3.4.3 塔玛亚历山大藻的孢囊 .....	80
第五节 小结 .....	81
<b>第四章 <i>Ochromonas</i> sp. 与塔玛亚历山大藻及其藻际细菌相互关</b>	
<b>系的研究 .....</b>	<b>83</b>
第一节 实验材料、试剂与仪器 .....	83
4.1.1 实验材料 .....	83
4.1.2 实验试剂 .....	83
4.1.3 实验仪器 .....	83
第二节 实验方法 .....	84
4.2.1 主要试剂的配置 .....	84
4.2.2 塔玛亚历山大藻的分离 .....	86
4.2.3 <i>Ochromonas</i> sp. 的分离 .....	87
4.2.4 细菌的分离 .....	87
4.2.5 纯净度的检测 .....	88
4.2.6 塔玛亚历山大藻、 <i>Ochromonas</i> sp. 及细菌的共培养 .....	89
4.2.7 细胞密度的统计 .....	90
4.2.8 激光共聚焦显微镜样品制备 .....	90
4.2.9 塔玛亚历山大藻孢囊透射电子显微镜样品制备 <sup>[201]</sup> .....	90
第三节 结果 .....	91
4.3.1 塔玛亚历山大藻、 <i>Ochromonas</i> sp. 及细菌分离的结果 .....	91
4.3.2 <i>Ochromonas</i> sp. 的生长 .....	94
4.3.3 细菌的生长 .....	96
4.3.4 塔玛亚历山大藻的生长 .....	99
4.3.5 “藻际” 的观察 .....	101

第四节 讨论 .....	106
4.4.1 <i>Ochromonas</i> sp. 与细菌的相互关系 .....	106
4.4.2 塔玛亚历山大藻与细菌的相互关系 .....	107
4.4.3 <i>Ochromonas</i> sp.、塔玛亚历山大藻及细菌三者间的相互关系 .....	108
第五节 小结 .....	110
第五章 总结与展望 .....	111
一、总结 .....	111
二、创新点 .....	111
三、展望 .....	111
相关文献 .....	116
在学期间参与的课题与发表的论文 .....	132
致 谢 .....	133

# CONTENTS

<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract in English</b> .....	3
<b>Chapter 1: Introduction</b> .....	5
<b>1.1 Introduction of <i>Alexandrium tamarens</i></b> .....	5
1.1.1 Red tide of <i>Alexandrium tamarens</i> .....	5
1.1.2 Introduction of the concept of species interaction .....	6
1.1.3 Phcosphere of <i>Alexandrium tamarens</i> .....	7
1.1.4 Introduction of dinoflagellate cysts .....	10
<b>1.2 Introduction of <i>Ochromonas</i></b> .....	12
1.2.1 The taxonomy system of <i>Ochromonas</i> .....	12
1.2.2 The morphological characteristics of <i>Ochromonas</i> .....	12
1.2.3 The nutrient characteristics of <i>Ochromonas</i> .....	13
<b>1.3 Identification of microalgae</b> .....	14
1.3.1 Morphological taxonomy .....	14
1.3.2 Chemical taxonomy .....	14
1.3.3 Molecular biology taxonomy .....	15
<b>1.4 Advances and application in microfluidics research</b> .....	17
1.4.1 Application in Cell Biology research .....	18
1.4.2 Application in protein research.....	18
1.4.3 Application in DNA research .....	19
1.4.4 Application in Clinical diagnosis.....	19
1.4.5 Application in marine biology research.....	19
<b>1.5 Purpose and concept of this study</b> .....	20
<b>Chapter 2: The identification of <i>Ochromonas</i></b> .....	22
<b>2.1 Materials, reagents and instrucments</b> .....	22
2.1.1 Materials .....	22



2.1.2 Reagents.....	22
2.1.3 Instrucments.....	22
<b>2.2 Methods</b> .....	23
2.2.1 Solutions preparation .....	23
2.2.2 Culturing .....	24
2.2.3 Genome DNA extraction .....	24
2.2.4 18S rDNA、ITS and 5.8S rDNA sequence amplication.....	25
2.2.5 Purification of PCR production .....	26
2.2.6 Plasmid construction.....	26
2.2.7 Transformation of recombinant DNA .....	26
2.2.8 Clone.....	27
2.2.9 CaCl <sub>2</sub> competent cells preparation.....	27
2.2.10 SEM sample treatment.....	28
2.2.11 TEM sample treatment .....	28
<b>2.3 Results</b> .....	29
2.3.1 Morphology of flagellate.....	29
2.3.2 Molecular biology of flagellate .....	32
<b>2.4 Discussion</b> .....	41
<b>2.5 Conclucion</b> .....	45
 <b>Chapter 3 Research on ecology characterization of <i>Ochromonas</i> sp.</b>	
<b>base on microfluidics</b> .....	46
<b>3.1 Materials, reagents and instrucments</b> .....	46
3.1.1 Materials .....	46
3.1.2 Reagents.....	46
3.1.3 Instrucments.....	46
<b>3.2 Methods</b> .....	47
3.2.1 Solution preparation.....	47
3.2.2 Fabrication of the PDMS perfusion device .....	47
3.2.3 Fabrication of the concentration gradient chip.....	52
<b>3.3 Results</b> .....	57

3.3.1 The structure and performance of PDMS chip .....	57
3.3.2 Cultivation and observation of <i>A. tamarens</i> on PDMS chip.....	62
3.3.3 The structure and performance of concentration gradient chip .....	70
3.3.4 Cultivation and observation of <i>A. tamarens</i> on concentration gradient chip.....	72
<b>3.4 Discussion</b> .....	74
3.4.1 Design of microfluidic chip .....	74
3.4.2 The nutrition and proliferation of <i>Ochromonas</i> sp. ....	78
3.4.3 The cyst of <i>A. tamarens</i> .....	80
<b>3.5 Conclusion</b> .....	81
 <b>Chapter 4 Studise on interactions among <i>Ochromonas</i> sp., <i>A.</i></b>	
<b><i>tamarens</i> and bacteria in phycosphere</b> .....	83
 <b>4.1 Materials, reagents and instrucments</b> .....	83
4.1.1 Materials .....	85
4.1.2 Reagents.....	83
4.1.3 Instrucments.....	83
<b>4.2 Methods</b> .....	84
4.2.1 Solution preparation.....	84
4.2.2 Isolatio of <i>A. tamarens</i> .....	86
4.2.3 Isolation of <i>Ochromonas</i> sp.....	87
4.2.4 Isolation of bacteria .....	87
4.2.5 Axenic examination .....	88
4.2.6 Co-culture of <i>A. tamarens</i> , <i>Ochromonas</i> sp. and bacteria .....	89
4.2.7 Statistics of cell density .....	90
4.2.8 CLSMsample preparation.....	90
4.2.9 TEM sample preparation .....	90
<b>4.3 Results</b> .....	91
4.3.1 Isolation resulte of <i>A. tamarens</i> , <i>Ochromonas</i> sp. and bacteria.....	91
4.3.2 The growth of <i>Ochromonas</i> sp. ....	94
4.3.3 The growth of bacteria.....	96
4.3.4 The growth of <i>A. tamarens</i> .....	99

4.3.5 Observation of phycosphere .....	101
<b>4.4 Discussion .....</b>	<b>106</b>
4.4.1 Interaction between <i>Ochromonas</i> sp. and bacteria .....	106
4.4.2 Interaction between <i>A. tamarensis</i> and bacteria .....	107
4.4.3 Interactions among <i>Ochromonas</i> sp., <i>A. tamarensis</i> and bacteria .....	108
<b>4.5 Conclusion .....</b>	<b>110</b>
<b>Chapter 5 Review and prospect .....</b>	<b>114</b>
<b>Reference .....</b>	<b>116</b>
<b>Published papers and participated research projects .....</b>	<b>132</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>133</b>

## 摘要

本文发现了一种生活在塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 藻际中的棕鞭藻。通过形态学和分子生物学的综合分析, 确定该棕鞭藻为棕鞭藻 (*Ochromonas* sp.)。应用传统生物学与现代微流控技术相结合的手段, 研究了该棕鞭藻的生活习性, 并对藻际中塔玛亚历山大藻、棕鞭藻、细菌三者之间的相互关系进行了研究。本文的研究内容主要有一下几个方面:

1. 通过光学显微镜、荧光显微镜和扫描电子显微镜对该棕鞭藻进行了形态学观察, 确定了棕鞭藻的大小为 2-3 $\mu\text{m}$ , 外表呈球形, 头部端具不等长的两条鞭毛, 其中短鞭毛长度约为体长, 长鞭毛长度约为体长 3-5 倍, 具鞭毛茸毛; 细胞内具两个色素体。透射电子显微镜的观察结果显示, 细胞内部细胞核、色素体、色素体一内质网膜、金藻昆布糖囊泡、鞭毛基部等棕鞭藻的典型细胞结构。

2. 通过设计特殊引物分步、扩增出了棕鞭藻的 18s rDNA、ITS 以及部分 28s rDNA 序列, 与 NCBI 上已发布的序列进行比对。综合形态学和分子生物学结果确定了该棕鞭藻属于金藻门(Chrysophyta)、棕鞭藻属的一个种(*Ochromonas* sp.)。

3. 设计并制作了一种 PDMS 灌流芯片和一种玻璃浓度梯度芯片, 并对两种芯片的功能性进行了检测。结合显微镜下的实时拍摄技术, 对芯片上连续培养的棕鞭藻和塔玛亚历山大藻进行了长时间的跟踪拍摄, 详细纪录了棕鞭藻二分裂、摄食细菌、被细菌裂解, 以及塔玛亚历山大藻暂时性孢囊运动和萌发的过程。

4. 鉴定出了三种被棕鞭藻摄食的细菌, 并分析了这些细菌与塔玛亚历山大藻之间的关系。利用离心、膜分离、施加抗生素的方法, 将藻际中的棕鞭藻、塔玛亚历山大藻及细菌分离出来。再通过不同组合形式的共培养, 确定了三者之间存在以下三组相互关系: (1) 棕鞭藻—细菌之间直接的负相互关系; (2) 细菌—塔玛亚历山大藻之间直接的负相互关系; (3) 棕鞭藻—塔玛亚历山大藻之间间接的正相互关系。棕鞭藻通过与塔玛亚历山大藻之间的正相互关系, 在一定程度上控制了塔玛亚历山大藻的生长。对物种间相互关系的研究, 将帮助我们更好地预防与控制有害赤潮。

**关键词：**棕鞭藻；塔玛亚历山大藻；物种间相互关系

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

In this study, a small flagellate microalgal species was observed to live in the phycosphere of toxic red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. Phylogenetic analysis and ultrastructural observations demonstrated that the flagellate microalga occurred in the phycosphere is a species of *Ochromonas* sp. By combination of traditional biological methods with modern microfluidic chip technology, the characterization of *Ochromonas* sp. and the species interactions in the phycosphere of *A. tamarense* were studied. The results were as follows:

1. Light microscopy, TEM and SEM were used to investigate the morphology and ultrastructure of the small flagellate microalga. Cells of the flagellate microalga were spherical, naked and measured 2-3  $\mu\text{m}$  and two unequal flagella arised from the anterior face to the cell. The long anterior flagellum (about 3-5 times the length of the cell) which beared with mastigonemeis directed forwards. Image under fluorescence microscopy indicates each cell of flagellate containing two chloroplasts. TEM image shown that the nucleus and chloroplast enclosed by the endoplasmatic reticulum which may continuous with the nuclear envelope.

2. The typical ultrastructure of the flagellate microalga was also observed, such as chrysolaminarin vacuole and complex flagellum basal body. Combined with the phylogenetic analysis of 18s rDNA, ITS and 28s rDNA, this flagellate microalga was identified to be *Ochromonas* sp.

3. Two kinds of microfluidic chips were fabricated to culture *Ochromonas* sp. and *A. tamarense*. The time taps capture under microscope was used to monitor the cell cultured on the microfluidic chips. Finally, process of ingesting bacteria, binary fission and lysised by bacteria of *Ochromonas* sp was recorded, as well as the movement and germination process of the *A. tamarense* cyst.

4. Three strains of bacteria ingested by *Ochromonas* sp. were isolated and identified

to belong to  $\alpha$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ - Proteobacteria respectively, and two of them were found have been reported had close relationship *A. tamarense*. After treated by centrifugate, membrane separation and antibiotics, axenic cultures of *Ochromonas* sp., *A. tamarense* and bacteria were obtained from the phycosphere. Through a different assemblies of coculture experiment, the species interactions in this phycosphere microenvironment were analysed. The result firstly uncovered a positive effect of *Ochromonas* sp. on dinoflagellate in the phycosphere of *A. tamarense*. This study of the interactions between species, will help us do better in prevention and control of harmful algal blooms.

**Keywords:** *Ochromonas* sp.; *Alexandrium tamarense*; Species interactions

## 第一章 引言

海洋是一种生物与环境,生物与生物之间相互依存,相互制约的复杂生态系统,系统中的物质循环,能量流动处于相对稳定的动态平衡<sup>[1]</sup>。随着生活水平的日益提高,人类对于资源的需要也与日俱增。在有限的陆地资源无法满足需求时,数量巨大且种类繁多的海洋生物成了人类研究和开发的重要资源,世界各沿海国家把注意力集中到了海洋生物资源的研究和开发上来。在对海洋资源进行开发、利用的同时,人类活动对海洋生态系统也产生了不容忽视的影响。近年来,全球赤潮爆发的频率、规模及其造成的危害都在逐渐上升。赤潮的爆发,在对浩瀚的海洋环境造成破坏的同时,也在水产养殖上给人类带来了巨大的损失<sup>[2]</sup>,更严重的还能给我们的健康带来危害。

对海洋生物资源的研究,很大程度上取决于生物技术的研究和发展水平。由于海洋生态系统构造庞大且复杂,赤潮爆发和消退在时间和空间上的不确定性,至今,我们对赤潮的认识还很不够。而要减轻赤潮给我们带来的灾害,关键在于了解赤潮的发生机制,即赤潮生物如何能在海洋生态群落中发展成优势种、外界环境中温度、盐度和营养物质以及海流等因子如何诱发赤潮等生态学和海洋学机制<sup>[3]</sup>。而这些都需要大量的实验研究,因而寻求新的手段也成了海洋科学研究的一个新的方向。

### 第一节 塔玛亚历山大藻的研究现状

#### 1.1.1 塔玛亚历山大藻赤潮简介

塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 属于甲藻门、甲藻纲、横裂甲藻亚纲、多甲藻目、亚历山大藻属,是一类可以产生毒素的赤潮甲藻,它被认为是产生神经性贝毒素 (PSP) 的主要物种<sup>[4]</sup>。该藻在较暖的水域,如美国、欧洲、南美、菲律宾、香港等地区有较高的赤潮发生频率<sup>[5, 6]</sup>。塔玛亚历山大藻生存范围广、适应能力强,在我国北至胶州湾、南至大鹏湾、厦门海域都有发现<sup>[7, 8]</sup>。由塔玛亚历山大藻产生的麻痹性贝毒可以通过鱼、贝类的累积而达到使人中毒的浓度<sup>[2]</sup>。因此,对



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.